

**Strips for Western blotting containing serum control and conjugate control zones, for detecting infection by bacterial or viral pathogens**

**Numéro du brevet:** DE10000322  
**Date de publication:** 2000-07-27  
**Inventeur:** HANKE CHRISTIAN (DE)  
**Demandeur:** BIOSENS GES FUER DIAGNOSTIKA M (DE)  
**Classification:**  
- internationale G01N33/561; G01N33/53; G01N33/569  
- européenne G01N33/569D; G01N33/543K4  
**Numéro de demande** DE20001000322 20000107  
**Numéro(s) de priorité:** DE20001000322 20000107; DE19992000214U  
19990109

**Abrégé pour DE10000322**

Strip for Western blotting includes, on a carrier, (i) a serum control zone (SCZ) which will produce a band following incubation with patient serum and (ii) at least one conjugate control zone (CCZ) which will produce a band following incubation with a labeled anti-patient immunoglobulin (Ig) antibody (Ab1) from a different animal species.

---

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 100 00 322 A 1**

⑤ Int. Cl. 7:  
**G 01 N 33/561**  
G 01 N 33/53  
G 01 N 33/569

⑲ Aktenzeichen: 100 00 322.2  
⑳ Anmeldetag: 7. 1. 2000  
㉑ Offenlegungstag: 27. 7. 2000

**DE 100 00 322 A 1**

⑥⑥ Innere Priorität:  
299 00 214. 4 09. 01. 1999

⑦① Anmelder:  
Biosens Gesellschaft für Diagnostika mbH, 82041  
Oberhaching, DE

⑦④ Vertreter:  
Boeters & Bauer, 81541 München

⑦② Erfinder:  
Hanke, Christian, Dr., 82131 Gauting, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Immuno-Blot-Streifen mit Kontrollzonen

⑤⑦ Die Erfindung betrifft einen Immuno-Blot-Streifen, beispielsweise einen Western-Blot-Streifen oder Dot-Blot-Streifen, der auf einem Träger eine Serumkontrollzone, welche die erfolgte Inkubation des Streifens mit Patientenserum durch eine entsprechende Bande anzeigt, und mindestens eine Konjugatkontrollzone, welche die erfolgte Inkubation des Streifens mit einem markierten Anti-Patienten-Immunglobulin-Antikörper aus einer anderen Tierspezies durch eine entsprechende Bande anzeigt, aufweist.

**DE 100 00 322 A 1**

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft Immuno-Blot-Streifen, beispielsweise Western-Blot-Streifen oder Dot-Blot-Streifen, mit mindestens zwei Kontrollzonen, die eine verbesserte differenzierte, zusätzliche Kontrolle ermöglichen und so eine erhöhte Sicherheit bei der Interpretation von Testergebnissen liefern.

Der Stand der Technik und die Erfindung werden im folgenden konkret anhand von Western-Blot-Streifen beschrieben, dies ist jedoch nur beispielhaft und die Ausführungen gelten allgemein für Immuno-Blots, insbesondere analog auch für Dot-Blot-Streifen.

Der Western-Blot spielt in der Routineserologie als sogenannter Bestätigungstest eine wichtige Rolle, da durch dieses Verfahren die Vorergebnisse anderer Enzym-Immuno-Assays, z. B. die eines ELISAs (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), letztendlich überprüft werden.

Das Western-Blotting dient in der Routineserologie dem Nachweis spezifischer Patienten (insb. Human)antikörper, die in der Regel zu den Immunglobulinklassen IgG, IgM und IgA gehören und die z. B. nach einer bakteriellen oder viralen Infektionskrankheit gebildet werden. Der Nachweis dieser spezifischen Patientenantikörper mit dem Western-Blot erlaubt es, indirekt auf eine stattgefundene oder eine akut bestehende bakterielle oder virale Infektion rückzuschließen und durch die Detektion der unterschiedlichen Immunglobulinklassen auch Aussagen wie etwa über den zeitlichen Verlauf der Infektion zu treffen.

Bei einer besonderen Ausführungsform des Immuno-Blots, dem Dot-Blot, werden in der Regel gereinigte Proteine (oder allgemein Antigene) direkt auf einen Träger, z. B. eine Membran, aufgebracht und dadurch immobilisiert.

Bei einer weiteren besonderen Ausführungsform des Immuno-Blots, dem Western-Blot, werden Proteine des Erregers abhängig von ihrer Größe gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Ein Teil der Membran wird als sogenannter Western-Blot-Streifen (analog wird beim Dot-Blot-Streifen vorgegangen) mit einem einzelnen Patienten (insbesondere Human)serum inkubiert, so daß Antikörper gegen den Erreger – soweit diese im Serum vorhanden sind – in der Regel an diese immobilisierten Erregerproteine binden. Der gebundene spezifische Antikörper des Patienten (insbesondere des Menschen) wird dann durch einen zweiten Antikörper aus einer anderen Tierespezies (z. B. Kaninchen, Ziege), der meist mit einem Enzym wie z. B. der alkalischen Phosphatase oder mit Peroxidase zur Markierung gekoppelt bzw. konjugiert ist, nachgewiesen. In der Routineserologie handelt es sich bei diesem sogenannten Konjugat um einen enzymkonjugierten Antikörper aus einer anderen Tierespezies, der beispielsweise gegen menschliches Immunglobulin gerichtet ist (allgemein auch als Anti-Antikörper oder Sekundäntikörper bezeichnet), also z. B. Anti-Human-IgG-Konjugat aus z. B. Kaninchen oder Ziege. Das Enzym des Konjugates reagiert mit einem weiteren zugesetzten Stoff, mit dem Substrat, wobei sich das Reaktionsprodukt als gefärbte "Bande" auf die Membran niederschlägt. Einzelne Banden oder das Muster der Banden auf der Membran erlauben es dann, eine Aussage über die Infektion mit einem bestimmten Erreger zu machen.

Da sich das Ergebnis des Immuno-Blots, beispielsweise des Western-Blots oder Dot-Blots, als Bandenmuster auf einer Membran erst nach diesen aufeinanderfolgenden Schritten offenbart, die verschiedene mögliche Fehlerquellen beinhalten können, ist es gerade bei dem hohen Probendurchsatz in der Routineserologie wünschenswert, einzelne

Schritte des gesamten Verfahrens durch Kontrollen zu überprüfen.

Indirekte Erregernachweise, z. B. Nachweise von Antikörpern gegen Bakterien und Viren, haben in der Routinediagnostik einen festen Platz. Insbesondere bei chronischen Infektionen oder Spätstadien von bakteriellen und viralen Infekten sind Antikörpernachweise ein nützliches Instrument, um die Ursache der Beschwerden einzukreisen – auf eine den Patienten schonende Weise.

Nachweise von Antikörpern werden heute üblicherweise in Form einer Stufendiagnostik durchgeführt, mit empfindlichem Screening und spezifischer Bestätigung. Dabei dient das Screening dem Ausschluß der richtig negativen Proben, die Bestätigung dem Ausschluß falsch positiver Proben.

Übersehene Primärinfektionen führen nicht selten zu chronischen oder komplizierten Verläufen, die nicht nur beschwerdereicher für die Patienten sind, sondern häufig auch schwieriger zu therapieren. Ziel der Routineserologie ist es also, möglichst früh und zuverlässig zu diagnostizieren, um Spätfolgen zu vermeiden. Eine falsche Diagnose hat vielfach eine falsche Therapie zur Folge.

Ein Beispiel: die Borrelien-Serologie. Seit vielen Jahren fordern Experten weltweit eine zuverlässige standardisierbare Serologie zum Nachweis von Borrelien-Infektionen. Hierbei ist die getrennte Erfassung von Frühphasen-Antikörpern (IgM) und Spätphasen-Antikörpern (IgG) genauso von Bedeutung, wie das Erkennen kreuzreagierender Antikörper, die gegen andere Erreger gerichtet sein können.

In der oben erwähnten Stufendiagnostik werden seit einigen Jahren Elisa-Teste zum Screening und Western-Blots zur Bestätigung eingesetzt. Bei den Western-Blots wird das Erreger-Antigen elektrophoretisch getrennt, auf einen Teststreifen übertragen und nacheinander mit Patientenserum, Immunglobulin-spezifischem Konjugat und zuletzt Substrat inkubiert. Das Ergebnis sind positiv gefärbte Banden auf dem Teststreifen, sofern Borrelien-spezifische Antikörper im Serum vorhanden waren, bzw. keine solchen Banden auf dem Streifen, wenn Antikörper im Serum fehlten.

Diese Western-Blots werden getrennt für IgM und IgG angesetzt. Dabei ist es mit Blick auf die genannte Expertenforderung nach Sicherheit und Zuverlässigkeit sehr wichtig, alle Testschritte im nachhinein kontrollieren zu können. Zwei Beispiele sollen die Risiken in der Routine verdeutlichen:

Ein nach Testdurchführung weißer Streifen – also ein Streifen ohne Banden – kann darauf schließen lassen, daß sich im untersuchten Serum keine spezifischen Antikörper befanden. Ein Streifen ohne Banden entsteht aber auch, wenn die Hinzugabe des Patientensерums nicht stattfand, z. B. vergessen wurde.

Ein Serum, das Frühphasen- aber keine Spätphasen-Antikörper gegen Borrelien enthält (typisches Bild bei einer frischen Infektion), zeigt normalerweise einen positiven IgM- und einen negativen IgG-Teststreifen. Sollte durch ein Versehen der IgM-Streifen irrtümlich mit IgG-Konjugat inkubiert worden sein, erscheinen hier beide Teststreifen negativ. Die Folge ist ein falsch negativer Befund. Falls durch diese Fehldiagnose eine Therapie unterbleibt, kann die Infektion unbemerkt in eine Spätphase wechseln, mit möglicherweise lebensbedrohlichen Folgen für den Patienten. So ist z. B. am Münchener Landgericht ein Fall einer nicht erkannten – da falsch negativ diagnostizierten – Borreliose aktenkundig (Aktenzeichen LGI 250 7114/95).

Einige der kommerziell angebotenen Western-Blots weisen eine "Funktionskontrollbande" bzw. eine "Reaktionskontrollbande" auf, die entweder die Zugabe des Serums oder des Konjugats überprüfbar macht. Diese Bande erscheint bei ordnungsgemäß durchgeführten Test immer,

wenn ein Konjugat einer beliebigen Ig-Klasse zugefügt wurde. Diese Tests gestatten daher nicht die Unterscheidung, welches Konjugat (z. B. IgG oder IgM) für den Test eingesetzt wurde, so daß die Möglichkeit der oben beschriebenen Fehldiagnose besteht.

Die in dem US-Patent 5,447,837 beschriebenen Teststreifen weisen eine positive und eine negative Kontrollzone auf. Die positive Kontrollzone zeigt die Inkubation mit Serum an, die negative Kontrollzone dagegen ist auf ein Antigen gerichtet, daß normalerweise im Patienten nicht vorkommt.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, durch differenzierte Systemkontrollen in Form von mindestens zwei unterschiedlichen, auf einem Immuno-Blot-Streifen, beispielsweise einem Western-Blot-Streifen oder Dot-Blot-Streifen, aufgetragenen Kontrollzonen sowohl die erfolgte Zugabe des Serums als auch die Funktionalität des eingesetzten Konjugats (z. B. Anti-Human-IgG-Konjugat) zu überprüfen, um so bestimmte Fehler zu erkennen, die auf diese Faktoren zurückzuführen sind.

Insbesondere ist es nach einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung mit mehreren unterschiedlichen Kontrollzonen möglich, zu bestimmen, welches Konjugat zum Immuno-Blot-Streifen, beispielsweise Western-Blot-Streifen oder Dot-Blot-Streifen, gegeben wurde. Dadurch werden Verwechslungen ausgeschlossen.

Bei einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung ist außerdem eine "Cut-off"-Sensorzone vorgesehen, mit deren Hilfe auf einfache Weise die geeignete Inkubationszeit ermittelt werden kann (bisher befand sich die "Cut-off"-Sensorzone auf einem separaten Immuno-Blot-Streifen, beispielsweise Western-Blot-Streifen oder Dot-Blot-Streifen).

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe mit Immuno-Blot-Streifen gemäß Patentanspruch 1 gelöst.

Weitere vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

Die Fig. I bis VI geben als Beispiel für Immuno-Blot-Streifen Western-Blot-Streifen mit mehreren Kontrollzonen nach der Erfindung wieder. Die detaillierte Beschreibung erfolgt weiter unten in Verbindung mit den entsprechenden Beispielen I bis VI. Es wird nochmals darauf hingewiesen, daß die Ausführungen in analoger Weise auch für Dot-Blot-Streifen gelten.

Die Art und Weise wie die nachzuweisenden Antigene auf die Immuno-Blot-Streifen aufgebracht werden, spielt für die Anwendbarkeit der Erfindung keine Rolle.

Western-Blotting, d. h. Proteinblotting auf einen Träger zur Immobilisierung mit anschließender Immundetektion ist eine gut eingeführte immunologische Arbeitstechnik und wird beispielsweise von F. Lottspeich und H. Zorbas (Hrsg.) in "Bioanalytik", Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 1998 (S. 94ff.) beschrieben.

Die elektrophoretische Auftrennung eines beliebigen Proteingemisches vor dem Western-Blotting unterliegt keinen besonderen Beschränkungen und kann beispielsweise durch SDS-Gelelektrophorese nach der Größe bzw. dem Molekulargewicht oder durch isoelektrische Fokussierung oder, zur Verbesserung der Auflösung, durch eine Kombination beider Techniken, d. h. sog. 2D-Elektrophorese, erfolgen. Diese elektrophoretischen Trenntechniken sind in der Bioanalytik seit Jahren gut eingeführt (vgl. z. B. die entsprechenden Kapitel in Lottspeich/Zorbas, supra) und bedürfen daher keiner weiteren Erörterung.

Das sich anschließende eigentliche Western-Blotting, d. h. das Übertragen, der aufgetrennten Proteine auf einen Träger (z. B. Nitrocellulose) zur Immobilisierung unterliegt ebenfalls keinen besonderen Beschränkungen und kann z. B. durch Kapillarblotting oder Elektroblothing erfolgen.

Diese Blotting-Techniken sind in der Bioanalytik seit Jahren gut eingeführt (vgl. z. B. die entsprechenden Kapitel in Lottspeich/Zorbas, supra) und bedürfen daher ebenfalls keiner weiteren Erörterung.

Die Immundetektion, d. h. die Sichtbarmachung der Antikörperbindung, kann direkt unter Verwendung entsprechend markierter Primärantikörper (d. h. der spezifisch gegen das Antigen gerichteten Antikörper) oder indirekt unter Verwendung entsprechend markierter Antikörper gegen den Primärantikörper aus einer anderen Tierspezies (d. h. sog. Sekundärantikörper oder auch Anti-Antikörper) erfolgen. Da die indirekte Immundetektion eine höhere Empfindlichkeit hat, wird sie hier bevorzugt eingesetzt. Zur Markierung kann ein beliebiges System verwendet werden, z. B. das Biotin/Avidin-(Streptavidin)-, das kolloidale Gold- oder ein enzymgekoppeltes System (z. B. unter Verwendung von Peroxidase oder alkalischer Phosphatase). Diese Immunoassays sind in der Bioanalytik seit Jahren gut eingeführt (vgl. z. B. die entsprechenden Kapitel in Lottspeich/Zorbas, supra) und bedürfen daher ebenfalls keiner weiteren Erörterung. Es ist auch selbstverständlich, das sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper verwendet werden können.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß sich hier die Bezeichnung "Konjugat" zwar im allgemeinen auf enzymkonjugierte Anti-Human-Immunglobulin-Antiseren bzw. enzymkonjugierte Sekundärantikörper bezieht, jedoch der Begriff in analoger Weise auch andere Markierungssysteme für Anti-Human-Immunglobulin-Antiseren bzw. allgemein Sekundärantikörper aus einer anderen Tierspezies umfassen soll, z. B. das Biotin/Avidin-(Streptavidin)- oder kolloidale Gold-System. Das Konjugat wäre in diesen Fällen z. B. ein biotinylierter Sekundärantikörper, der mit markiertem (z. B. mit biotinylierter alkalischer Phosphatase oder Peroxidase) Avidin reagiert, oder ein Sekundärantikörper, an den kolloidale Goldpartikel zur Sichtbarmachung gebunden sind. Analog gilt dies auch für die Bezeichnungen "Konjugatkontrollzone/-bande".

Die Auftragung der erfindungsgemäßen Kontrollzonen erfolgt nach einem üblichen Dot-Verfahren (vgl. z. B. die entsprechenden Kapitel in Lottspeich/Zorbas, supra), z. B. mit einer Hamilton-Mikrospritze oder einer Mikrosprühvorrichtung.

Die Immundetektion beim Western-Blotting wird hier konkret vorzugsweise wie folgt durchgeführt.

#### Testdurchführung

Die folgenden allgemeinen Hinweise sind zu beachten:

- Alle Testreagenzien (d. h. Antikörper-Enzym-Konjugat, Verdünnungs-/Waschpuffer, Enzymsubstrat, Western-Blot-Streifen, die allgemein im Handel in Form von entsprechenden Testkits für die Routineserologie erhältlich sind) sind vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) zu bringen.
- Verdünnungen sind vor dem Testansatz gut zu durchmischen.
- Die Testdurchführung erfolgt bei Raumtemperatur.
- Antigenstreifen sind nur mit einer Plastikpinzette am oberen markierten Ende in die Inkubationswannen zu überführen.
- Während sämtlicher Inkubationsschritte muß die markierte Seite der Streifen mit dem gebundenen Antigen nach oben gerichtet sein.
- Es ist darauf zu achten, daß die Antigenstreifen gleichmäßig mit Flüssigkeit bedeckt sind und daß die Streifen während der gesamten Testdurchführung nicht trocknen dürfen.

- Alle Inkubationsschritte werden auf einem Kipp-schüttler durchgeführt.
- Veränderungen der angegebenen Inkubationszeiten und Verdünnungen können zu falschen Ergebnissen führen.
- Für jedes Reagenz sind frische Pipettenspitzen zu verwenden.
- Kreuzkontamination zwischen Konjugat und Chromogen/Substrat sind unbedingt zu vermeiden.

1. Für jede Antigenprobe wird je 1 Western-Blot-Streifen mit der Plastikpinzette in eine Rinne einer sauberen Inkubationswanne gelegt.

2. Je 2 ml gebrauchsfertiger Verdünnungs-/Waschpuffer werden in die Rinnen der sich auf dem Schüttler befindlichen Inkubationswanne pipettiert, um die Streifen vollständig zu befeuchten.

3. Je 20 µl Patientenserum werden zupipettiert, und zwar möglichst am oberen markierten Streifenende. Damit eine vollständige Durchmischung mit dem Verdünnungs-/Waschpuffer gewährleistet ist, erfolgt die Serumzugabe auf dem laufenden Schüttler. Patientenserum und Kontrollserum werden 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Beim Pipettieren und anschließenden Abgießen ist darauf zu achten, daß es nicht zu einer Kreuzkontamination der einzelnen Patientenproben kommt.

4. Die Flüssigkeit wird aus den Rinnen vollständig abgesaugt, oder vorsichtig abgossen. Beim Abgießen der Flüssigkeit bleiben die Western-Blot-Streifen mit dem Antigen am Boden der Rinnen haften. Restflüssigkeit wird auf einem Saugpapier abtropfen gelassen.

5. Waschen der Western-Blot-Streifen: mit je 2 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer wird 3 x 5 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Der Waschpuffer wird immer vollständig abgesaugt oder abgossen.

Vor Ablauf des letzten Waschschrittes wird die benötigte Menge an frischer Konjugatverdünnung (entsprechend den Herstellerangaben in der Packungsbeilage zum Testkit) hergestellt.

6. Die Flüssigkeit wird aus den Rinnen vollständig abgesaugt oder abgossen.

7. Je 2 ml der hergestellten Konjugatverdünnung werden in die entsprechenden Inkubationsrinnen pipettiert, worauf 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert wird.

8. Die Flüssigkeit wird aus den Rinnen vollständig abgesaugt oder abgossen.

9. Waschen der Western-Blot-Streifen: mit je 2 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer wird 3 x 5 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Der Waschpuffer wird immer vollständig abgesaugt oder abgossen. Anschließend wird 1 x 1 Minute mit Aqua dest. gespült.

10. Die Flüssigkeit wird aus den Rinnen vollständig abgesaugt oder abgossen (siehe Punkt 4).

11. Je 2 ml gebrauchsfertige Substratlösung werden in die Rinnen der Inkubationswanne pipettiert, worauf 10 Minuten auf dem Schüttler entwickelt gelassen wird.

12. Die Farbentwicklung wird durch Abgießen der Substratlösung abgestoppt. Anschließend werden die Streifen ohne Zwischeninkubation 3 x mit je 2 ml Aqua dest. gewaschen. 13. Das Aqua dest. wird abgossen und die Western-Blot-Streifen auf einem sauberen saugfähigen Papier getrocknet.

14. Zur Auswertung werden das Auswertungsprotokoll und die kitspezifische Schablone des jeweiligen Herstellers verwendet.

#### Auswertung

Zur sicheren Auswertung ist jeder Western-Blot-Streifen mit einer Serumkontrollzone und drei separaten Konjugatkontrollzonen ausgestattet.

#### Serumkontrolle

Nur nach der Inkubation mit Patientenserum erscheint unterhalb der Markierungslinie des Western-Blot-Streifens die Serumkontrollbande. Bei der Serumkontrollzone handelt es sich um ein aufgebracht Gemisch aus Anti-Human-IgG-, Anti-Human-IgM- und Anti-Human-IgA-Antiserum aus einer anderen Tierspezies (z. B. Kaninchen, Ziege), das mit den entsprechenden Immunglobulinen im Patientenserum reagiert, worauf sich durch weitere Reaktion mit dem zum Nachweis der Erregerantigene verwendeten enzymkonjugierten Anti-Human-IgG-/IgM-/IgA-Antiserum eine Bande ergibt.

#### Konjugatkontrollzone

Der Western-Blot-Streifen ist ferner mit mindestens einer weiteren Kontrollzone versehen, die nur nach der Inkubation mit einem Konjugat eine Bande ergibt. Im einfachsten Fall handelt es sich bei dieser Konjugatkontrollzone um ein aufgebracht Gemisch aus Anti-Tierspezies-IgG-, Anti-Tierspezies-IgM- und Anti-Tierspezies-IgA-Antiserum, wobei sich hier die Angabe "Tierspezies" auf die andere Tierspezies (z. B. Kaninchen, Ziege) bezieht, deren enzymkonjugiertes Anti-Human-IgG-/IgM-/IgA-Antiserum zum Nachweis der Erregerantigene verwendet wurde.

Wenn beispielsweise ein enzymkonjugiertes Anti-Human-IgG-Antiserum aus Ziege zum Nachweis der Erregerantigene und zur Bildung der Konjugatkontrollbande verwendet wurde, ist in der Konjugatkontrollzone Anti-Ziege-IgG-Antiserum aus einer anderen Tierspezies aufgebracht. Für die anderen Immunglobulinklassen gilt dies analog.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind drei Konjugatkontrollzonen vorgesehen, und zwar in Form von separat aufgebrachtem Anti-Tierspezies-IgG-, Anti-Tierspezies-IgM- und Anti-Tierspezies-IgA-Antiserum, wobei die obigen Ausführungen in analoger Weise zutreffen. Wird ein bestimmtes Konjugat eingesetzt, erscheint an der entsprechenden Stelle des Western-Blot-Streifens eine Bande.

Die Testdurchführung ist korrekt erfolgt, wenn auf dem entwickelten Antigenstreifen sowohl die Serumkontrollbande als auch die Konjugatkontrollbande deutlich zu erkennen sind.

Bei einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung ist außerdem eine "Cut-off"-Sensorzone vorgesehen, mit deren Hilfe auf einfache Weise die geeignete Inkubationszeit mit dem Substrat ermittelt werden kann. Wenn die Western-Blot-Streifen zu lange mit dem Substrat inkubiert werden, treten möglicherweise unspezifische Banden auf, so daß die Auswertung erschwert wird. Die "Cut-off"-Sensorzone ergibt eine Bande, anhand deren Intensität sich erkennen läßt, ob die Inkubation mit dem Substrat abzubrechen ist. Schwächere Banden als die "Cut-off"-Bande werden nicht berücksichtigt.

In der "Cut-off"-Sensorzone kann zum Beispiel das gleiche Gemisch aus Anti-Human-IgG-, Anti-Human-IgM- und Anti-Human-IgA-Antiserum aus einer anderen Tierspezies

(z. B. Kaninchen, Ziege) wie in der Serumkontrollzone aufgebracht sein, allerdings in einer geringeren Konzentration (z. B. 1/5 der Konzentration in der Serumkontrollzone). Geeignete Konzentrationen wählt der Fachmann nach Maßgabe der praktischen Gegebenheiten bzw. sind durch einfache Routineversuche zu ermitteln.

Alternativ kann auch ein spezifisches Erregerantigen zur Festlegung des "Cut-offs" verwendet werden, wobei die obigen Ausführungen in analoger Weise gelten.

#### Beispiel I (Fig. I)

Dargestellt sind Western-Blot-Streifen nach der Inkubation mit Patientenserum, die IgG- bzw. IgM- bzw. IgA-Antikörper gegen einen bakteriellen Erreger, wie z. B. B. burgdorferi, enthalten (Positivserum) und die mit Anti-Human-IgG-Konjugat (Fig. 1A) bzw. Anti-Human-IgM-Konjugat (Fig. 1B) bzw. Anti-Human-IgA-Konjugat (Fig. 1C) (aus Ziege) entwickelt wurden. Die Streifen können – je nach der Immunglobulinklasse des Konjugats – unterschiedliche erregerspezifische Banden (e) zeigen. Eine Konjugatkontrollbande (b, c, d) bildet sich, wenn der Streifen mit einem Konjugat entwickelt wurde. Die Serumkontrollbande (a) bildet sich, wenn Patientenserum zusammen mit einem Konjugat entwickelt wurde. Die Reihenfolge der Kontrollzonen auf dem Streifen ist: Serumkontrollzone (a), IgG-Konjugatkontrollzone (b), IgM-Konjugatkontrollzone (c), IgA-Konjugatkontrollzone (d). Diese Reihenfolge muß aber nicht eingehalten werden, sondern kann beliebig sein.

#### Beispiel II (Fig. II)

Dargestellt ist ein Western-Blot-Streifen nach der Inkubation mit einem Patientenserum, das keine IgA-Antikörper gegen einen bakteriellen Erreger, wie z. B. B. burgdorferi, enthält (Negativserum) und der mit einem Anti-Human-IgA-Konjugat entwickelt wurde. Auf dem Streifen sind daher keine erregerspezifischen Banden zu erkennen, sondern nur die Serumkontrollbande (a) und die IgA-Konjugatkontrollbande (d). Der Test ist korrekt durchgeführt worden, da die Serumkontrollbande und die Konjugatkontrollbande sichtbar sind.

#### Beispiel III (Fig. III)

Dargestellt ist ein Western-Blot-Streifen nach der Inkubation mit einem Anti-Human-IgG-Konjugat. Auf dem Streifen sind keine erregerspezifischen Banden zu erkennen. Es ist nur eine IgG-Konjugatkontrollbande (b) sichtbar. Dieser Befund zeigt, daß der Streifen ohne Serumzugabe entwickelt wurde. Der Test ist inkorrekt durchgeführt worden und muß daher unter Serumzugabe wiederholt werden.

#### Beispiel IV (Fig. IV)

Durchgeführt wurde ein Western-Blot zur Detektion von IgG-Antikörpern. Es sind erregerspezifische Banden (e) und die IgM-Konjugatkontrollbande (c) sichtbar. Dieser Befund zeigt, daß ein Anti-Human-IgM-Konjugat statt eines Anti-Human-IgG-Konjugats zugegeben wurde. Der Test ist korrekt durchgeführt worden, aber mit dem falschen Konjugat. Der Test muß daher unter Zugabe des Anti-Human-IgG-Konjugats wiederholt werden.

#### Beispiel V (Fig. V)

Es sollte ein Western-Blot zur Detektion von IgG-Antikörpern durchgeführt werden. Es sind keine Kontrollbanden

auf dem Streifen zu sehen und der Test ist daher inkorrekt durchgeführt worden. Dieser Befund zeigt, daß zumindest kein Konjugat zugegeben wurde. Der Test muß daher unter Zugabe eines Anti-Human-IgG-Konjugats wiederholt werden.

#### Beispiel VI (Fig. VI)

Durchgeführt wurden Western-Blots zur Detektion von IgG-Antikörpern mit den Streifen der Nummern 1 bis 4 aus dem Kit mit der Lotnummer (A1–A4) bzw. zur Detektion von IgA-Antikörpern mit den Streifen 1 bis 4 aus dem Kit mit der Lotnummer (B1–B4). Die mit dem Anti-Human-IgG-Konjugat bzw. Anti-Human-IgA-Konjugat entwickelten Streifen wurden versehentlich durcheinandergedrückt. Durch die IgG- bzw. IgA-Konjugatkontrollbanden ist es dennoch möglich, die Streifen 1 bis 4 der Lotnummer A bzw. B zuzuordnen.

Mit Hilfe der Kontrollzonen ist der Anwender des Western-Blots in der Lage zwischen richtigen und falsch negativen sowie richtigen und falsch positiven Untersuchungsergebnissen zu differenzieren. Außerdem können technische Fehler und Durchführungsfehler erkannt und spezifiziert werden.

Im Hinblick auf die eingangs angeführte Experten-Forderung ist das Testsystem "Western-Blot" durch die erfindungsgemäßen Kontrollzonen wesentlich verbessert worden.

#### Patentansprüche

1. Immuno-Blot-Streifen, der auf einem Träger eine Serumkontrollzone, welche die erfolgte Inkubation des Streifens mit Patientenserum durch eine entsprechende Bande anzeigt, und mindestens eine Konjugatkontrollzone, welche die erfolgte Inkubation des Streifens mit einem markierten Anti-Patienten-Immunglobulin-Antikörper aus einer anderen Tierspezies durch eine entsprechende Bande anzeigt, aufweist.

2. Immuno-Blot-Streifen nach Anspruch 1, der drei separate Konjugatkontrollzonen, welche die erfolgte Inkubation des Streifens mit markierten Anti-Patienten-Immunglobulin-Antikörpern aus einer anderen Tierspezies durch eine entsprechende Bande anzeigen und ob das Anti-Patienten-Immunglobulin gegen IgG, IgM oder IgA gerichtet ist, aufweist.

3. Immuno-Blot-Streifen nach Anspruch 1 oder 2, der außerdem eine Cut-off-Sensorzone zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit mit dem Substrat aufweist.

4. Immuno-Blot-Streifen nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Serumkontrollzone eine Gemisch aus immobilisierten Anti-Patienten-Immunglobulin-Antikörpern sämtlicher Klassen aufweist.

5. Immuno-Blot-Streifen nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei im Falle

(a) nur einer Konjugatkontrollzone diese ein Gemisch aus immobilisierten Anti-Tierspezies-Immunglobulin-Antikörpern sämtlicher Klassen aufweist und

(b) dreier separater Konjugatkontrollzonen jede davon nur immobilisierte Anti-Tierspezies-Immunglobulin-Antikörper einer der Klassen IgG, IgM oder IgA aufweist,

wobei sich die Angabe "Tierspezies" auf die andere Tier-Spezies bezieht, von der die markierten Anti-Patienten-Immunglobulin-Antikörper stammen.

6. Immuno-Blot-Streifen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Markierung der Anti-Patienten-

ten-Immunglobulin-Antikörper auf dem Biotin/Avi-  
din(Streptavidin)-, dem kolloidalen Gold- oder einem  
enzymkonjugierten System (ELISA) beruht.

7. Immuno-Blot-Streifen nach Anspruch 5, wobei das  
ELISA-System mit Peroxidase oder alkalischer Phos- 5  
phatase konjugierte Anti-Patienten-Immunglobulin-  
Antikörper umfaßt.

8. Immuno-Blot-Streifen nach einem der vorhergehen-  
den Ansprüche, wobei es sich bei dem Patienten um ei- 10  
nen Menschen handelt.

9. Immuno-Blot-Streifen nach einem der vorhergehen-  
den Ansprüche, wobei es sich bei der anderen Tierspe-  
zies um eine Maus, ein Kaninchen oder eine Ziege han-  
delt.

10. Immuno-Blot-Streifen nach einem der vorherge- 15  
henden Ansprüche, wobei es sich um Western-Blot-  
Streifen oder Dot-Blot-Streifen handelt.

---

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

---

20

25

30

35

40

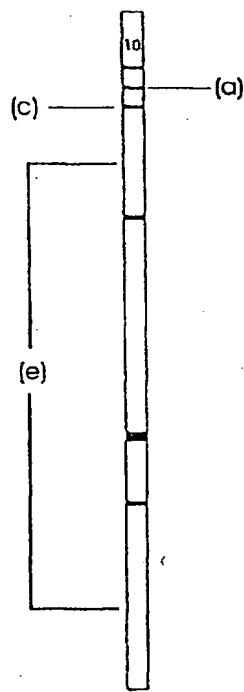
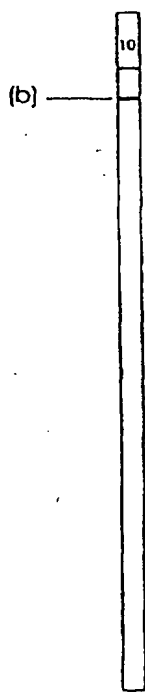
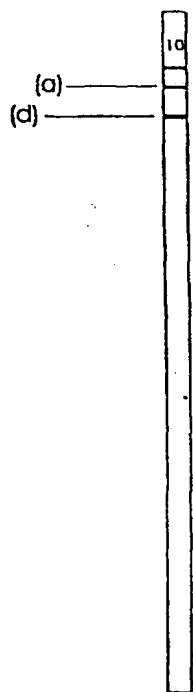
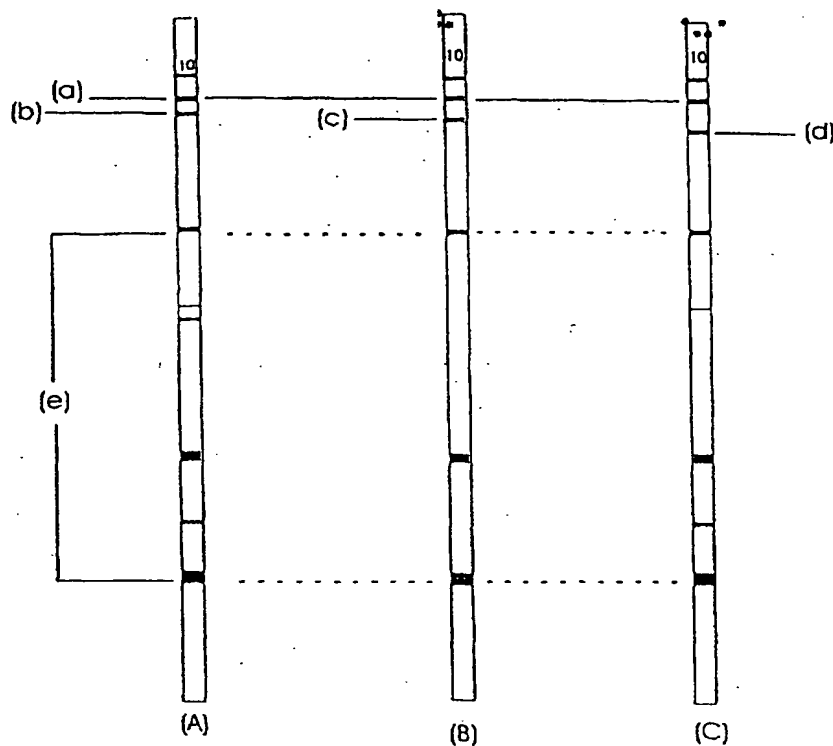
45

50

55

60

65





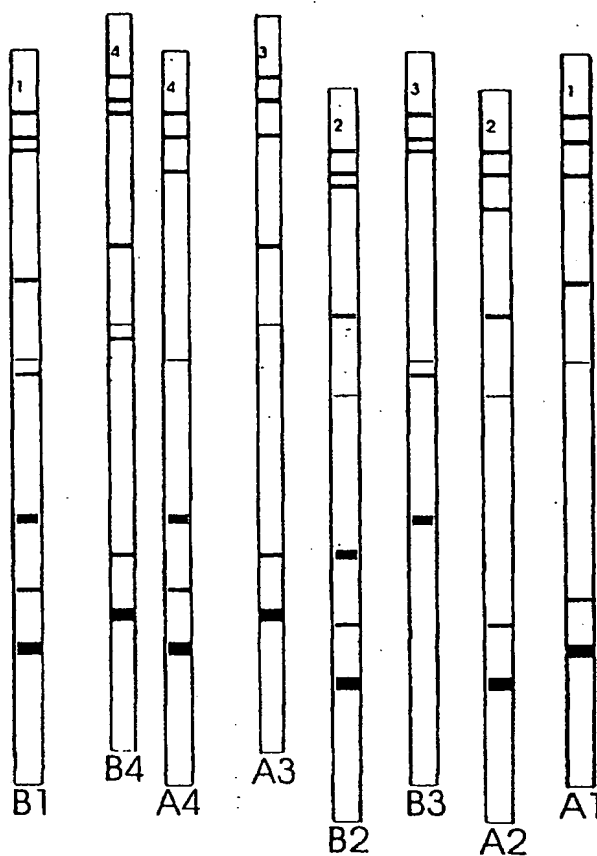


Fig. VI

BEST AVAILABLE COPY